



TITLE:

A β 1-tubulin-based megakaryocyte maturation reporter system identifies novel drugs that promote platelet production(Abstract_要旨)

AUTHOR(S):

Seo, Hideya

CITATION:

Seo, Hideya. A β 1-tubulin-based megakaryocyte maturation reporter system identifies novel drugs that promote platelet production. 京都大学, 2019, 博士(医学)

ISSUE DATE:

2019-01-23

URL:

<https://doi.org/10.14989/doctor.k21454>

RIGHT:

京都大学	博士（医学）	氏 名	瀬 尾 英 哉
論文題目	A β 1-tubulin-based megakaryocyte maturation reporter system identifies novel drugs that promote platelet production (β 1-tubulin 遺伝子発現に基づく巨核球成熟レポーターシステムによる血小板産生を促進する薬剤の同定)		
(論文内容の要旨)			
<p>血小板は巨核球から産生され、血栓止血に重要な役割を果たす無核の細胞である。現在、広く用いられている血小板輸血製剤は献血ドナーの血液から製造されている。この献血ドナーにのみ依存した血小板供給システムは、先進国で進む高齢化によって需要と供給の均衡が脅かされており、血小板輸血不応症およびウイルスや細菌感染等の安全上のリスクも排除し切れない。</p> <p>近年、胚性幹細胞および人工多能性幹細胞（induced pluripotent stem cells: iPS 細胞）研究が進み、献血ドナーに依存しない血小板の供給源になる可能性が示された。特に、iPS 細胞を巨核球前駆細胞に分化誘導する過程で、c-MYC、BMI-1、BCL-XL 遺伝子を導入することにより樹立された不死化巨核球前駆細胞株(immortalized megakaryocyte progenitor cell line: imMKCL)は革新的な血小板供給源として有力視されている。一方で、imMKCL の成熟は不完全で、生体内の巨核球に比べ血小板産生効率が低く、臨床応用においては解決しなければならない課題である。</p> <p>本研究では、imMKCL の成熟を指標とするスクリーニングにより血小板産生効率を改善させる薬剤を同定することが可能であるか否かを検証した。巨核球/血小板には β1-tubulin が特異的に発現しており、巨核球成熟が進むに従いその発現量を増加させる。β1-tubulin は巨核球において微小管を構成することで血小板前駆体を形成し、効率的な血小板産生には必須であるとされる。まず imMKCL を用い β1-tubulin 遺伝子の発現量を簡便にモニターできる細胞株の樹立を試み、CRISPR/Cas9 法によって、蛍光タンパクである VENUS 遺伝子を β1-tubulin 遺伝子直後に挿入した β1-tubulin-VENUS レポーターimMKCL の樹立に成功した。このレポーターimMKCL では、β1-tubulin 発現量が蛍光顕微鏡でリアルタイムに可視化されるので、蛍光強度を観測することで巨核球成熟を定量化することが可能である。次いで、レポーターimMKCL を用いたハイスループットスクリーニング系を確立し、5000 種以上の薬剤ライブラリから血小板産生を促進する薬剤を複数種同定した。これら薬剤は iPS 細胞及びヒト臍帯血から誘導した巨核球に対して血小板産生効率を大きく改善させただけでなく、血小板減少モデルマウスにおいて血小板回復を増強したことから、imMKCL のみならず生体外、生体内の巨核球の血小板産生に対して促進的であることが示された。また、同定した薬剤の多くは芳香族炭化水素受容体 (aryl hydrocarbon receptor : AhR) 経路を競合阻害していた。AhR に対する siRNA は imMKCL の成熟を促し血小板産生効率を上昇させたことから、AhR 経路の抑制が巨核球成熟に重要な役割を担っていることが確認された。さらに複数の薬剤の作用を解析することにより、AhR に依存しない巨核球成熟促進経路の存在が示唆された。</p> <p>本研究を通し、β1-tubulin を指標とした巨核球成熟スクリーニングは、血小板産生効率</p>			

<p>を改善する薬剤の同定だけでなく、巨核球成熟に関与する経路の解析にも有用であることが示された。本システムは、血小板の体外製造と臨床応用を推し進め、未だ明らかにされていな血小板造血メカニズムを明らかにする上においても革新的なツールとなる可能性がある。</p> <p>（論文審査の結果の要旨）</p> <p>血小板輸血製剤は献血ドナーの血液から製造されており、その需要と供給の不均衡に対し、安全で安定したドナー非依存血小板供給システムの開発が望まれている。</p> <p>人工多能性幹細胞を巨核球前駆細胞に分化誘導する過程で遺伝子操作を加え樹立された不死化巨核球前駆細胞株(immortalized megakaryocyte progenitor cell line: imMKCL)は、革新的な血小板供給源として有力視されている一方で、その成熟は不完全で血小板産生効率が低く、改善が必須な課題を有している。</p> <p>本研究では、CRISPR/Cas9 法により蛍光タンパク遺伝子を巨核球の成熟マーカーの一つである β1-tubulin 遺伝子配列直後に挿入した β1-tubulin-VENUS レポーターimMKCL を樹立し、薬剤スクリーニングによって血小板産生効率を改善する薬剤を 12 種同定することに成功した。これら 12 薬剤のうち 5 薬剤は芳香族炭化水素受容体（aryl hydrocarbon receptor : AhR）経路の競合阻害活性を有し、AhR 経路の抑制が巨核球成熟に重要な役割を担うことが確認された。また、他の 7 薬剤において AhR に依存しない巨核球成熟促進経路が関与することが示唆された。</p> <p>以上の研究は、ドナー非依存血小板輸血システムの開発だけでなく、血小板造血機序の解明に貢献し、今後の血小板研究に寄与するところが多い。</p> <p>したがって、本論文は博士（医学）の学位論文として価値のあるものと認める。</p> <p>なお、本学位授与申請者は平成 30 年 12 月 21 日実施の論文内容とそれに関連した諮問を受け、合格と認められたものである。</p>			
要旨公開可能日： 年 月 日 以降			